

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
17. Februar 2005 (17.02.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2005/015151 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>5</sup>: C12N 5/08,  
A61K 35/28

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/008865

(22) Internationales Anmeldedatum:  
6. August 2004 (06.08.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
103 36 152.9 6. August 2003 (06.08.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EP-  
PENDORF (DE/DE); Martinistrasse 52, 20246 Hamburg  
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LANGE, Claudia  
(DE/DE); Herlingsburg 27, 22529 Hamburg (DE). ZAN-  
DER, Axel, Rolf (DE/DE); Wulfsdorfer Weg 131, 22359  
Hamburg (DE).

(74) Anwälte: WEBER-QUITZAU, Martin usw.; Uexküll &  
Stolberg, Beselerstrasse 4, 22607 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,  
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,  
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,  
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 28. April 2005

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR PURIFYING MESENCHYMAL STEM CELLS

(54) Bezeichnung: AUFREINIGUNGSVERFAHREN FÜR MESENCHYMALE STAMMZELLEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for purifying mesenchymal stem cells, producing cells corresponding to prior art, the cells obtained being characterised by an increased proliferation capacity while maintaining the multipotency and typical antigen characteristics. To this end, mesenchymal stem cells that can be multiplied in a significantly improved manner compared to prior art are first provided and can also be differentiated, after a longer cultivation period, in three mesenchymal directions.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufreinigung mesenchymaler Stammzellen, das dem Stand der Technik entsprechende Zellausbeuten liefert, wobei sich die erhaltenen Zellen durch eine gesteigerte Proliferationskapazität unter gleichzeitiger Beibehaltung der Multipotenz und der typischen Antigen-Charakteristika auszeichnen. Damit stehen erstmals mesenchymale Stammzellen zur Verfügung, die sich gegenüber dem Stand der Technik deutlich besser vermehren lassen und darüber hinaus auch nach längerer Kultivierung noch in drei mesenchymale Richtungen differenzieren lassen.

BEST AVAILABLE COPY

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/008865

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N5/08 A61K35/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)  
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X          | WO 97/40137 A (OSIRIS THERAPEUTICS, INC;<br>KADIYALA, SUDHA; BRUDER, SCOTT, P;<br>MUSCHLER,) 30 October 1997 (1997-10-30)<br>page 52 | 1-14                  |
| X          | US 5 965 436 A (THIEDE ET AL)<br>12 October 1999 (1999-10-12)<br>column 4  | 1-14                  |
| X          | WO 01/94541 A (UNIVERSITY OF SOUTH<br>FLORIDA; SESHU, BEERELLI)<br>13 December 2001 (2001-12-13)<br>page 29 - page 30                | 1-14                  |
| X          | US 5 197 985 A (CAPLAN ET AL)<br>30 March 1993 (1993-03-30)<br>example 1   | 1-8                   |
| -/-        |  |                       |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 March 2005

Date of mailing of the international search report

11/03/2005

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Teyssier, B

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/008865

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X          | "Percoll: Methodology and Applications"<br>2001, AMERSHAM BIOSCIENCES, XP002316866<br>Retrieved from the Internet:<br>URL: <a href="http://www.cellseparation.nu/media/18-1115-69AC.pdf">http://www.cellseparation.nu/media/18-1115-69AC.pdf</a><br>figure 11  | 9-13                  |
| A          | the whole document   |                       |
| A          | PHINNEY D G ET AL: "Donor variation in<br>the growth properties and osteogenic<br>potential of human marrow stromal cells"<br>JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY,<br>vol. 75, no. 3,<br>1 December 1999 (1999-12-01), pages<br>424-436, XP002316863<br>ISSN: 0730-2312<br>cited in the application   |                       |
| A          | PITTENGER M F ET AL: "Multilineage<br>potential of adult human mesenchymal stem<br>cells"<br>SCIENCE,<br>vol. 284, no. 5411,<br>2 April 1999 (1999-04-02), pages 143-147;<br>XP002316864<br>ISSN: 0036-8075<br>cited in the application  |                       |
| A          | BRUDER S P ET AL: "Growth kinetics,<br>self-renewal, and the osteogenic potential<br>of purified human mesenchymal stem cells<br>during extensive subcultivation and<br>following cryopreservation"<br>JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY,<br>vol. 64, no. 2, 1997, pages 278-294,<br>XP002316865<br>ISSN: 0730-2312<br>cited in the application |                       |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP2004/008865

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)  | Publication<br>date  |
|---|---|---------------------|---|--|
| WO 9740137                                | A | 30-10-1997          | AU 731468 B2<br>AU 2462297 A<br>CA 2251983 A1<br>EP 0906415 A1<br>JP 2000508911 T<br>US 6541024 B1<br>WO 9740137 A1<br>US 2003031695 A1 | 29-03-2001<br>12-11-1997<br>30-10-1997<br>07-04-1999<br>18-07-2000<br>01-04-2003<br>30-10-1997<br>13-02-2003 |
| US 5965436                                | A | 12-10-1999          | AU 5436998 A<br>CA 2271758 A1<br>EP 0941027 A1<br>JP 2001510330 T<br>WO 9820731 A1  | 03-06-1998<br>22-05-1998<br>15-09-1999<br>31-07-2001<br>22-05-1998   |
| WO 0194541                                | A | 13-12-2001          | AU 6476301 A<br>WO 0194541 A2<br>US 2003203483 A1   | 17-12-2001<br>13-12-2001<br>30-10-2003   |
| US 5197985                                | A | 30-03-1993          | US 6010696 A<br>US 5733542 A<br>US 5811094 A<br>US 5837539 A  | 04-01-2000<br>31-03-1998<br>22-09-1998<br>17-11-1998   |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PC1/EP2004/008865

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12N5/08 A61K35/28

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile                            | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X          | WO 97/40137 A (OSIRIS THERAPEUTICS, INC; KADIYALA, SUDHA; BRUDER, SCOTT, P; MUSCHLER,) 30. Oktober 1997 (1997-10-30) Seite 52 | 1-14               |
| X          | US 5 965 436 A (THIEDE ET AL) 12. Oktober 1999 (1999-10-12) Spalte 4  | 1-14               |
| X          | WO 01/94541 A (UNIVERSITY OF SOUTH FLORIDA; SESHU, BEERELLI) 13. Dezember 2001 (2001-12-13) Seite 29 - Seite 30               | 1-14               |
| X          | US 5 197 985 A (CAPLAN ET AL) 30. März 1993 (1993-03-30) Beispiel 1   | 1-8                |
|            | -/-   |                    |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindertlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. März 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

11/03/2005

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Teyssier, B

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2004/008865

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN |  |                    |
|--|--|--------------------|
| Kategorie  | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
| X  | <p>"Percoll: Methodology and Applications"<br/>2001, AMERSHAM BIOSCIENCES, XP002316866<br/>Gefunden im Internet:<br/>URL: <a href="http://www.cellseparation.nu/media/18-1115-69AC.pdf">http://www.cellseparation.nu/media/18-1115-69AC.pdf</a><br/>Abbildung 11<br/>das ganze Dokument</p>  | 9-13               |
| A  | <p>PHINNEY D G ET AL: "Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells"<br/>JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY,<br/>Bd. 75, Nr. 3,<br/>1. Dezember 1999 (1999-12-01), Seiten 424-436, XP002316863<br/>ISSN: 0730-2312<br/>in der Anmeldung erwähnt</p>                                       |                    |
| A  | <p>PITTENGER M F ET AL: "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells"<br/>SCIENCE,<br/>Bd. 284, Nr. 5411,<br/>2. April 1999 (1999-04-02), Seiten 143-147, XP002316864<br/>ISSN: 0036-8075<br/>in der Anmeldung erwähnt</p>  |                    |
| A  | <p>BRUDER S P ET AL: "Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation"<br/>JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY,<br/>Bd. 64, Nr. 2, 1997, Seiten 278-294, XP002316865<br/>ISSN: 0730-2312<br/>in der Anmeldung erwähnt</p> |                    |

# INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Abzeichen

PCT/EP2004/008865

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument |   | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|---|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 9740137   | A | 30-10-1997                    | AU 731468 B2                      | 29-03-2001                    |
|  |   |                               | AU 2462297 A                      | 12-11-1997                    |
|  |   |                               | CA 2251983 A1                     | 30-10-1997                    |
|  |   |                               | EP 0906415 A1                     | 07-04-1999                    |
|  |   |                               | JP 2000508911 T                   | 18-07-2000                    |
|  |   |                               | US 6541024 B1                     | 01-04-2003                    |
|  |   |                               | WO 9740137 A1                     | 30-10-1997                    |
|  |   |                               | US 2003031695 A1                  | 13-02-2003                    |
| US 5965436   | A | 12-10-1999                    | AU 5436998 A                      | 03-06-1998                    |
|  |   |                               | CA 2271758 A1                     | 22-05-1998                    |
|  |   |                               | EP 0941027 A1                     | 15-09-1999                    |
|  |   |                               | JP 2001510330 T                   | 31-07-2001                    |
|  |   |                               | WO 9820731 A1                     | 22-05-1998                    |
| WO 0194541   | A | 13-12-2001                    | AU 6476301 A                      | 17-12-2001                    |
|  |   |                               | WO 0194541 A2                     | 13-12-2001                    |
|  |   |                               | US 2003203483 A1                  | 30-10-2003                    |
| US 5197985   | A | 30-03-1993                    | US 6010696 A                      | 04-01-2000                    |
|  |   |                               | US 5733542 A                      | 31-03-1998                    |
|  |   |                               | US 5811094 A                      | 22-09-1998                    |
|  |   |                               | US 5837539 A                      | 17-11-1998                    |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**